

(62)

PRODUCTION OF L-PHENYLALANINE

Veröffentlichungsnr. (Sek.) JP5123178
Veröffentlichungsdatum : 1993-05-21
Erfinder : TSUCHIDA TAKAYASU; others: 01
Anmelder :: AJINOMOTO CO INC
Originalnummer : ☐ JP5123178
Anmeldenummer : JP19910287594 19911101
Prioritätsnummer :
Klassifikation IPK : C12P13/22
Klassifikation EK :
Korrespondierende Patentschriften

Zusammenfassung

PURPOSE: To obtain the subject amino acid useful as a raw material for sweetener, pharmaceuticals, etc., on an industrial scale at a low cost by treating a fermentation liquid containing L-phenylalanine and L-tyrosine, etc., with a cultured product of a microorganism having beta-tyrosinase activity, etc., and separating the product.

CONSTITUTION: L-phenylalanine having high purity is produced in high efficiency by treating an L-phenylalanine fermentation liquid containing by-produced or remaining L-tyrosine or a liquid obtained from the separation process, e.g. a culture liquid of an L-phenylalanine-producing strain (e.g. *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21420) with a microorganism having beta-tyrosinase activity (e.g. *Erwinia herbicola* ATCC 21433), microbial cell separated from the cultured product or treated microbial cell to effect the decomposition of L-tyrosine and separating and purifying L-phenylalanine by conventional method such as concentration, solvent extraction and ionexchange resin treatment.

Daten aus der esp@cenet Datenbank - - I2

19. Japanisches Patentamt (JP)
12. Ungeprüfte Veröffentlichung der Patentanmeldung (A)
11. Veröffentlichungsnummer: 5-123178
43. Veröffentlichungsdatum: 21. 05. 1993
51. Int. Cl.⁵: C12P 13/22 // (C12P 13/22, C12R 1:18),
(C12P 13/22, C12R 1:01), (C12P 13/22, C12R 1:185), (C12P 13/22,
C12R 1:37), (C12P 13/22, C12R 1:20), (C12P 13/22, C12R 1:05)
Prüfungsantrag nicht gestellt
21. Patentanmeldenummer: 3-287594
22. Anmeldedatum: 01. 11. 1991
71. Anmelder: 000000066
Aji no moto K.K., Tokyo
72. Erfinder: Takayasu TSUCHIDA, Kanagawa
72. Erfinder: Yoshitaka NISHIMOTO, Kanagawa
54. Titel der Erfindung:

Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin

57. ZUSAMMENFASSUNG:

Aufbau: Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin, dadurch gekennzeichnet, dass auf eine Fermentationslösung oder eine Isolatlösung, in der L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind, eine Kultur von Mikroorganismen, die β -Tyrosinaseaktivität haben, Mikroorganismenkörper, die von dieser Kultur abgetrennt worden sind, oder behandelte Mikroorganismenkörper einwirken gelassen werden und L-Tyrosin abgebaut wird, wonach L-Phenylalanin abgetrennt wird.

Wirkung: Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, L-Tyrosin leicht aus L-Phenylalanin-Fermentationslösungen, in denen L-Tyrosin als Nebenprodukt oder als Rest vorhanden ist, oder aus Isolatlösungen davon zu entfernen und hochreines L-Phenylalanin effizient zu isolieren.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin, dadurch gekennzeichnet, dass auf eine Fermentationslösung oder eine Isolatlösung, in der L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind, eine Kultur von Mikroorganismen, die β -Tyrosinaseaktivität haben, Mikroorganismenkörper, die von dieser

Kultur abgetrennt worden sind, oder behandelte Mikroorganismenkörper einwirken gelassen werden und L-Tyrosin abgebaut wird, wonach L-Phenylalanin abgetrennt wird.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG:

[0001] Gebiet der gewerblichen Anwendung:

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin. L-Phenylalanin wird als pharmazeutische Aminosäure oder als Ausgangsmaterial für den Süßstoff L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylester verwendet.

[0002] Stand der Technik:

Als Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin sind schon länger Verfahren bekannt (siehe geprüfte Veröffentlichung Nr. JP 37-6345, geprüfte Veröffentlichung Nr. JP 51-28712, geprüfte Veröffentlichung Nr. JP 2-4276, ungeprüfte Veröffentlichung Nr. JP 60-66984), die auf Fermentationsverfahren unter Verwendung von gegen Phenylalanin analog oder Tyrosin analog resistenten Varianten, Varianten, die Tyrosin brauchen, durch Gentechnik gezüchteten Bakterien etc. basieren, die zu den Familien der Brevibakterien, Corynebakterien, Arthrobacter, Bacillus oder Escherichia gehören. Bei diesen Verfahren ist neben dem Hauptprodukt L-Phenylalanin in der Fermentationslösung auch L-Tyrosin als Nebenprodukt oder als Rest vorhanden, wodurch sich das Problem ergibt, dass hochreines L-Phenylalanin nur schwer mit hoher Ausbeute zu isolieren ist.

[0003] Aufgaben, die durch die vorliegende Erfindung gelöst werden sollen:

Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem hochreines L-Phenylalanin aus einer Fermentationslösung oder einer Isolatlösung, in der L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind, einfach isoliert werden kann.

[0004] Mittel zur Lösung dieser Aufgaben:

Um ein Verfahren zu entwickeln, mit dem hochreines L-Phenylalanin aus einer Fermentationslösung oder einer Isolatlösung, in der L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind, effizient isoliert werden kann, haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung genaue Studien durchgeführt und kamen zu dem Ergebnis,

dass hochreines L-Phenylalanin erhalten werden und die isolierte Menge gesteigert werden kann, indem auf eine Fermentationslösung oder eine Isolatlösung, in der L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind, eine Kultur von Mikroorganismen, die β -Tyrosinaseaktivität haben, Mikroorganismenkörper, die von dieser Kultur abgetrennt worden sind, oder behandelte Mikroorganismenkörper einwirken gelassen werden und L-Tyrosin abgebaut wird, wonach L-Phenylalanin isoliert wird; auf Basis dieser Erkenntnis konnte die vorliegende Erfindung gemacht werden.

[0005] Denn mit der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass auf eine Fermentationslösung oder eine Isolatlösung, in der L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind, eine Kultur von Mikroorganismen, die β -Tyrosinaseaktivität haben, Mikroorganismenkörper, die von dieser Kultur abgetrennt worden sind, oder behandelte Mikroorganismenkörper einwirken gelassen werden und L-Tyrosin abgebaut wird, wonach L-Phenylalanin abgetrennt wird.

[0006] Die Fermentationslösung, um die es in der vorliegenden Erfindung geht, kann jegliche Fermentationslösung sein, in der L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind; als konkrete Beispiele können Fermentationslösungen unter Verwendung von L-Phenylalanin produzierenden Bakterien wie im Folgenden angeführt genannt werden.

Brevibacterium lactofermentum ATCC 21420

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 21421

Arthrobacter protoformie ATCC 21422

Escherichia coli AJ 11379 (FERM P-5043)

[0007] Als Beispiele für die Isolatlösung können weiters Lösungen, bei denen die Bakterien aus der o.g. Fermentationslösung entfernt worden sind, mit Ionenaustauscherharz behandelte Lösungen, konzentrierte Lösungen, nach der Kristallisation wieder gelöste Lösungen etc. angeführt werden.

[0008] Für die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Mikroorganismen mit β -Tyrosinaseaktivität gibt es keine besonderen Einschränkungen; als konkrete Beispiele können die folgenden aufgezählt werden:

Erwinia herbicola ATCC 21433

Citrobacter freundii (*Escherichia intermedia*) ATCC 6750

Proteus mirabilis ATCC 15290

Enterobacter cloacae (*Aerobacter aerogenes*) ATCC 7256

Flavobacterium flavescens (*Alkaligenes fecalis*) ATCC 8315

[0009] Durch Kultivieren dieser Mikroorganismen in flüssigem Kulturmedium kann eine Kultur von Mikroorganismen mit β -Tyrosinaseaktivität erhalten werden. Als flüssiges Kulturmedium können beliebig übliche natürliche oder synthetische Kulturmedien verwendet werden, die Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze und organische Nährstoffe enthalten.

[0010] Als Kohlenstoffquellen können Glukose, Fruktose, Saccharose, Mannose, Maltose, Mannit, Xylose, Galaktose, Stärke, Sirup, Glycerin, Sorbit u.ä. Zucker oder Zuckeralkohole, Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Fumarsäure, Maleinsäure u.ä. organische Säuren, Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol u.ä. Alkohole, andere Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe etc. als Hauptkohlenstoffquellen oder als Nebenkohlenstoffquellen verwendet werden; für ihre Konzentration gibt es keine besonderen Einschränkungen, aber üblicherweise sind 0,1 bis 10%, bezogen auf das Kulturmedium, geeignet.

[0011] Als Stickstoffquellen können Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumacetat u.ä. verschiedenste anorganische oder organische Ammoniumsalze oder Harnstoff, Ammoniak, Ammoniakgas etc. verwendet werden; außerdem ist auch die Verwendung von Maisseinweichflüssigkeit (corn steep liquor), Fleischextrakt, Pepton, NZ-Amin, Eiweißhydrolysaten, Aminosäuren u.ä. organischen Proteinsubstanzen etc. möglich.

[0012] Als anorganische Salze können weiters primäres Kaliumphosphat, sekundäres Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, primäres Eisensulfat, Mangansulfat, Zinksulfat, Kupfersulfat, Calciumcarbonat etc. verwendet werden. Als organische Nährstoffe gibt es Aminosäuren, verschiedene Vitamine, organische Säuren, Fettsäuren und andere proteinische Substanzen etc. Diese können nicht nur in ihrer reinen Form, sondern auch als natürliche Stoffe, die sie enthalten, verwendet werden, z.B. Fleischextrakt, Pepton, Hefeextrakt, Trockenhefe,

Maiseinweichflüssigkeit, Magermilchpulver, Chlorellaextrakt, mit Salzsäure hydrolysierte, entfette Sojabohnen, Mieki (Warenbezeichnung), Extrakte und Abbauprodukte von Tieren und Pflanzen, Fischen und Meeresfrüchten, Mikroorganismenkörpern etc.

[0013] β -Tyrosinase wird als passendes Enzym angesehen, und bei der Herstellung einer Kultur von Mikroorganismen, die β -Tyrosinaseaktivität haben, ist es notwendig, dass im Kulturmedium Tyrosin vorhanden ist. Daher gibt es keine Probleme, wenn von den dem Kulturmedium zugesetzten Nährsubstanzen genügend Tyrosin dazukommt, aber wenn dies nicht ausreicht, muss dem Kulturmedium Tyrosin zugesetzt werden. Das zugesetzte Tyrosin kann vom L-Typ, D-Typ oder DL-Typ sein, oder es können auch Salze von Tyrosin, Derivate etc. sein. Die Menge des zugesetzten Tyrosin variiert mehr oder weniger je nach den verwendeten Mikroorganismen, aber normalerweise liegt sie bei mindestens 0,01%, wobei etwa 0,1% bis 0,5% bevorzugt sind. Außerdem ist es im Allgemeinen wirksam, dem Kulturmedium Vitamin B6 zuzusetzen, um die β -Tyrosinaseaktivität zu erhöhen, wobei dies dem Kulturmedium üblicherweise in einer Konzentration von mindestens 5 mg/l zugesetzt wird.

[0014] Bei der Herstellung der in der vorliegenden Erfindung verwendeten Kultur von Mikroorganismen, die β -Tyrosinaseaktivität haben, kann die Kultivierung nach der Sterilisation der o.g. Kulturmedien nach bekannten Verfahren durch Impfung mit Mikroorganismen erfolgen. Bei den Kulturbedingungen gibt es bei der Temperatur zwar Unterschiede je nach den verwendeten Mikroorganismen, aber 15 bis 40°C sind geeignet, der pH sollte leicht sauer bis leicht alkalisch gehalten werden, und es ist auch möglich, zum Einstellen des pH während der Kultivierung Säuren oder Basen zuzusetzen. Als Kulturverfahren können sowohl Kultivierung unter Schütteln als auch unter Rühren mittels Gasdurchblasen eingesetzt werden; für die Kulturdauer gibt es keine Einschränkungen, wobei jedoch 10 bis 72 Stunden Kultivierung geeignet sind.

[0015] Die so erhaltene Kultur kann so wie sie ist auf L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam enthaltende Fermentationslösungen oder Isolatlösungen einwirken gelassen werden, es können auch die von der Kultur abgetrennten Mikroorganismen verwendet werden, oder es können, abgesehen von

Aceton-behandelten Bakterien oder verfestigten Bakterien, auch Lösungen von zerkleinerten Bakterien, die durch Zermahlen, Selbstverdauung, Behandlung mit Schallwellen o.ä. Verfahren erhalten wurden, oder behandelte Bakterienprodukte, die durch Zentrifugieren und Abtrennen, Aussalzen, Lösungsmittelpräzipitation o.ä. Verfahren erhalten wurden, einwirken gelassen werden.

[0016] Dadurch, dass die so erhaltene, β -Tyrosinaseaktivität aufweisende Kultur von Mikroorganismen, Mikroorganismenkörpern, die von dieser Kultur abgetrennt worden sind, oder Produkten von Behandlungen dieser Mikroorganismenkörper zu Fermentationslösungen oder Isolatlösungen zugesetzt und einwirken gelassen werden, in denen L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemeinsam vorhanden sind, kann L-Tyrosin enzymatisch abgebaut und entfernt werden.

[0017] Als Bedingungen für den enzymatischen Abbau sollten der pH auf 5 bis 10 und die Reaktionstemperatur auf 5 bis 60°C gehalten werden, die Reaktionszeit kann je nach Potenz der verwendeten β -Tyrosinase, der L-Tyrosinkonzentration der Fermentationslösung bzw. Isolatlösung etc. beliebig gewählt werden.

[0018] Die Isolierung des L-Phenylalanin nach dem Abbau des L-Tyrosins kann durch Konzentration, Lösungsextraktion, Behandlung mit Ionenaustauscherharz u.ä. üblichen Verfahren erfolgen.

[0019] Ausführungsbeispiele:

Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen noch detaillierter erläutert.

[0020] Ausführungsbeispiel 1:

Nachdem 60 ml Kulturmedium mit der in Tabelle 1 angegebenen Zusammensetzung in einen 500 ml Kolben gegeben und durch Erwärmen die Bakterien abgetötet worden waren, wurden die Bakterienkörper von im vorhinein auf einem schrägen Fleischsaft-Agar-Agar-Medium bei 28°C 20 Stunden lang kultivierten *Erwinia herbicola* ATCC 21433 auf Platin... [leider unleserlich; Anm. d. Ü.] geimpft und bei 27°C 20 Stunden lang unter Schütteln kultiviert. 1 l dieser Kultur wurde zentrifugiert, die Bakterien gesammelt, und die erhaltenen Bakterienkörper wurden als β -Tyrosinaseaktivität aufweisende Bakterienkörper genommen.

[0021] Tabelle 1

| Bestandteil | Konzentration |
|-------------------------|---------------|
| Glukose | 2 g/l |
| primäres Kaliumphosphat | 1 g/l |
| Magnesiumsulfat | 0,5 g/l |
| Fumarsäure | 7 g/l |
| L-Tyrosin | 2 g/l |
| Hefeextrakt | 10 g/l |
| Fleischextrakt | 5 g/l |
| Pyridoxin | 0,1 g/l |
| pH 7,5 | |

[0022] Auf der anderen Seite wurden die L-Phenylalanin produzierenden Bakterien *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21420 auf ein Kulturmedium aus ebenen Agar-Agar-Platten (pH 7,0) mit 1% Hefeextrakt, 1% Pepton, 0,5% Kochsalz und 0,5% Glukose geimpft und bei 31°C 24 Stunden lang kultiviert. Dann wurde als Hauptkulturmedium zur Produktion von L-Phenylalanin das Kulturmedium mit der in Tabelle 2 angegebenen Zusammensetzung zu jeweils 20 ml in 500 ml Kolben gegeben, bei 110°C 10 Minuten lang hitzesterilisiert, danach 5% Calciumcarbonat (gesondert sterilisiert) zugesetzt, und dann wurden darauf die vorher auf ebenen Agar-Agar-Platten kultivierten Bakterienkörper geimpft und bei 31,5°C 72 Stunden lang unter Schütteln kultiviert. Nach Beendigung der Kultivierung wurden aus 2 l Fermentationslösung durch Zentrifugieren die Bakterienkörper abgetrennt und entfernt.

[0023] Tabelle 2

| Bestandteil | Konzentration |
|---|---------------|
| Glukose | 100 g/l |
| Ammoniumsulfat | 30 g/l |
| primäres Kaliumphosphat | 1 g/l |
| Magnesiumsulfat | 0,4 g/l |
| primäres Eisensulfat | 0,1 g/l |
| Mangansulfat | 0,01 g/l |
| Ammoniumacetat | 4 g/l |
| L-Tyrosin | 0,4 g/l |
| Biotin | 100 µg/l |
| Vitamin B ₁ | 100 µg/l |
| hydrolysiertes Sojaprotein (als Gesamtstickstoff) | 2 g/l |
| pH 7,0 | |

[0024] Zu 1 l dieser bakterienfrei gemachten Lösung wurde die gesamte Menge der oben angegebenen, β -Tyrosinaseaktivität aufweisenden Bakterienkörper von *Erwinia herbicola* ATCC 21433 zugesetzt, der pH auf 7,5 gebracht und bei 30°C 6 Stunden lang reagieren gelassen.

[0025] Es wurden in dem Fall, in dem die β -Tyrosinaseaktivität aufweisenden Bakterienkörper auf 1 l bakterienfreie Fermentationslösung einwirken gelassen wurden, und in dem Fall, in dem als Kontrolle auf 1 l der gleichen bakterienfreien Fermentationslösung keine β -Tyrosinaseaktivität aufweisenden Bakterienkörper wirken gelassen wurden, jeweils die Konzentrationen von L-Phenylalanin und L-Tyrosin gemessen. Weiters wurden die einzelnen Lösungen jeweils konzentriert und kristallisiert, dann wurden die Kristalle in reinem Wasser gelöst und die Konzentration und Kristallisation 3 Mal wiederholt, und es wurde der Gehalt an L-Phenylalanin und L-Tyrosin in den so erhaltenen Kristallen gemessen. Dabei wurden die in Tabelle 3 angegebenen Ergebnisse erhalten.

[0026] Tabelle 3

| | | Einwirkung von β -Tyrosinase | |
|--|-------------------------|------------------------------------|------|
| | | nein | ja |
| Konzentration in der bakterienfreien Lösung | L-Phenylalanin (g/l) | 15,3 | 15,3 |
| | L-Tyrosin (g/l) | 0,25 | 0 |
| Gehalt in isolierten Kristallen | L-Phenylalanin (g) | 9,20 | 9,52 |
| | L-Tyrosin (g) | 0,19 | 0 |

[0027] Hieraus ist ersichtlich, dass in dem Fall, in dem keine β -Tyrosinaseaktivität aufweisenden Bakterienkörper einwirken gelassen wurden, in den erhaltenen Kristallen Reste von L-Tyrosin vorhanden sind, während in dem Fall, in dem β -Tyrosinaseaktivität aufweisende Bakterienkörper einwirken gelassen wurden, das L-Tyrosin in der bakterienfreien Fermentationslösung abgebaut worden ist und hochreine L-Phenylalaninkristalle erhalten werden konnten, die kein L-Tyrosin enthalten.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-123178

(43) 公開日 平成5年(1993)5月21日

| | | | | |
|---------------------------|------|-----------|-----|--------|
| (51) Int.Cl. ³ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 P 13/22 | | C 6977-4B | | |
| // (C 1 2 P 13/22 | | | | |
| C 1 2 R 1:18) | | | | |
| (C 1 2 P 13/22 | | | | |
| C 1 2 R 1:01) | | | | |

審査請求 未請求 請求項の数1(全4頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|-----------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平3-287594 | (71) 出願人 | 000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号 |
| (22) 出願日 | 平成3年(1991)11月1日 | (72) 発明者 | 土田 隆康 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社川崎工場内 |
| | | (72) 発明者 | 西元 義隆 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社川崎工場内 |

(54) 【発明の名称】 L-フェニルアラニンの製造法

(57) 【要約】

【構成】 L-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくは単離工程液に、 β -チロシナーゼ活性を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体もしくは該微生物菌体の処理物を作用させてL-チロシンを分解せしめた後、L-フェニルアラニンを単離することを特徴とするL-フェニルアラニンの製造法。

【効果】 本発明の方法によれば、L-チロシンが副生もしくは残存するL-フェニルアラニン発酵液もしくはその単離工程液より容易にL-チロシンを除去することが可能で、高純度のL-フェニルアラニンを効率よく単離することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくは単離工程液に、 β -チロシナーゼ活性を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体もしくは該微生物菌体の処理物を作用させてL-チロシンを分解せしめた後、L-フェニルアラニンを単離することを特徴とするL-フェニルアラニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はL-フェニルアラニンの製造法に関する。L-フェニルアラニンは医薬用アミノ酸あるいは甘味料であるL-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルの原料として有用である。

【0002】

【従来の技術】従来、L-フェニルアラニンの製造法としては、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、アルスロバクター属、パチルス属あるいはエシェリヒア属に属し、フェニルアラニンアナログもしくはチロシンアナログに耐性な変異株、チロシン要求性の変異株、遺伝子操作で育種した菌株等を用いた発酵法による製造法が知られている（特公昭37-6345号、特公昭51-28712号、特公平2-4276号、特開昭60-66984号公報参照）。これらの方法では、発酵液中に主たる生産物であるL-フェニルアラニンの他にL-チロシンが副生もしくは残存し、高純度のL-フェニルアラニンを高い収率で単離することが困難であるという問題点があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、L-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくは単離工程液から高純度のL-フェニルアラニンを容易に単離する方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、L-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくは単離工程液から高純度のL-フェニルアラニンを効率よく単離する方法を開発するために鋭意研究した結果、L-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくはその単離工程液に、 β -チロシナーゼ活性を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体もしくは該微生物菌体の処理物を作用させてL-チロシンを分解せしめた後、L-フェニルアラニンの単離を行うことにより、高純度のL-フェニルアラニンが得られ、単離収率が向上することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、L-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくは単離工程液に、 β -チロシナーゼ活性を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体もしくは該微生物菌体の

処理物を作用させてL-チロシンを分解せしめた後、L-フェニルアラニンを単離することを特徴とするL-フェニルアラニンの製造法を提供するものである。

【0006】本発明において対象となる発酵液は、L-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液であればいかなるものでもよいが、具体的に例示すると以下のようなL-フェニルアラニン生産菌を用いた発酵液が挙げられる。

プレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC

10 21420

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC

21421

アルスロバクター・プロトフォルミエ ATCC214

22

エシェリヒア・コリ AJ11379 (FERM P

-5043)

【0007】また、単離工程液の例としては、上記発酵液を除菌した液、イオン交換樹脂で処理した液、濃縮した液、晶析後再溶解した液等が挙げられる。

20 【0008】本発明で使用される β -チロシナーゼ活性を有する微生物に特に制限はないが、具体例としては以下のものが挙げられる。

エルビニア・ヘルピコーラ ATCC21433

シトロバクター・フロインディ (エシェリヒア・インターメディア)

ATCC6750

プロテウス・ミラビリス ATCC15290

エンテロバクター・クロアカエ (アエロバクター・アエロゲネス)

30 ATCC7256

フラボバクテリウム・フラベセンス (アルカリゲネス・フェカリス)

ATCC8315

【0009】これらの微生物を液体培地に培養することにより β -チロシナーゼ活性を有する微生物の培養物を得ることができる。液体培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類及び有機栄養素を含有する通常の天然あるいは合成培地が適宜用いられる。

40 【0010】炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、マンノース、マルトース、マンニトール、キシロース、ガラクトース、澱粉、糖蜜、グリセリン、ソルビトールなどの糖又は糖アルコール類、酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸等の有機酸類、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール類、その他脂肪酸類、炭化水素などが主な炭素源あるいは補助的炭素源として使用可能であり、その濃度は特に制限はないが、通常培地に対して0.1~10%が適当である。

50 【0011】また、窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニ

ウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の各種無機もしくは有機アンモニウム塩、あるいは尿素、アンモニア水、アンモニアガス等が用いられ、その他コーンステーパーリカー、肉エキス、ペプトン、N2-アミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸類等の有機蛋白性物質等の使用も可能である。

【0012】また、無機塩類としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅、炭酸カルシウム等が使用される。有機栄養素としては、アミノ酸類、各種ビタミン類、有機酸類、脂肪酸類、その他に蛋白性物質等がある。これらは純粋な形でなくてもそれらを含有する天然物質としても用いることができ、例えば、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンステーパーリカー、脱脂粉乳、クロレラエキス、脱脂大豆塩酸加水分解物、味液（商品名）、動植物、魚介類、微生物菌体のエキスや分解物等が用いられる。

【0013】なお、β-チロシナーゼは適応酵素と考えられ、β-チロシナーゼ活性を有する微生物の培養物の調製の際、培地中にチロシンが存在していることが必要である。従って、培地に添加する栄養物質から充分チロシンが入ってくる場合は問題ないが不十分な場合には培地中にチロシンを添加する必要がある。添加するチロシンはL型、D型、DL型いずれでもよく、またチロシンの塩類、誘導体等でもよい。添加するチロシンの量は使用する微生物菌体によっても多少相違するが、通常0.01%以上であり、0.1%ないし0.5%程度が好ましい。また一般にβ-チロシナーゼ活性を高めるために培地中にビタミンB6類を添加することが有効で通常培地中5mg/l以上の濃度で添加する。

【0014】本発明で使用するβ-チロシナーゼ活性を有する微生物の培養物の調製に当っては上記の如き培地を公知の方法で殺菌後、微生物を接種して培養を行えばよい。培養条件としては、温度は使用する微生物により差があるが、15℃ないし40℃が適当であり、pHは微酸性から微アルカリ性に保つとよく、その調整のために酸あるいはアルカリを培養の途中で添加することも可能である。培養の方法は振盪、通気攪拌培養のいずれでも実施可能であり、培養時間は特に制限はないが、10ないし72時間培養するのが適当である。

【0015】かくして得られる培養物をそのままL-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくは単離工程液に作用させてもよく、培養物より分離した微生物菌体を用いてもよく、また、アセトン処理菌体や固定化菌体の他、磨砕、自己消化、音波処理などの方法によって得た菌体破砕液もしくはこれらを遠心分離、塩析、溶媒沈殿などの方法で処理して得た菌体処理物として作用させることもできる。

【0016】この様にして得たβ-チロシナーゼ活性を

有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体もしくは該微生物菌体の処理物をL-フェニルアラニンとL-チロシンが共存する発酵液もしくは単離工程液に添加して作用させることにより、L-チロシンを酵素分解して除去することができる。

【0017】酵素分解の条件としては、pH5ないし10、反応温度5ないし60℃で保持すればよく、反応時間は使用するβ-チロシナーゼの力価、発酵液もしくは単離工程液中のL-チロシン濃度等に応じ適宜選択すればよい。

【0018】かくしてL-チロシンを分解せしめた後のL-フェニルアラニンの単離は、濃縮、溶剤抽出、イオン交換樹脂処理等の通常の方法により行うことができる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

【0020】

【実施例1】表1に示す組成の培地60mlを500ml容坂口コルベンに分注し加熱殺菌後、予め肉汁寒天斜面培地上で28℃、20時間培養したエルビニア・ヘルビコーラ ATCC 21433の菌体を白金耳量接種し、27℃で20時間振盪培養した。この培養物計1lを遠心分離して菌固し、得られた菌体をβ-チロシナーゼ活性含有菌体とした。

【0021】

【表1】

| 成分 | 濃度 |
|----------|---------|
| グルコース | 2 g/l |
| リン酸一カリウム | 1 g/l |
| 硫酸マグネシウム | 0.5 g/l |
| フマル酸 | 7 g/l |
| L-チロシン | 2 g/l |
| 酵母エキス | 10 g/l |
| 肉エキス | 5 g/l |
| ビリドキシン | 0.1 g/l |
| pH 7.5 | |

【0022】一方、L-フェニルアラニン生産菌であるプレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC 21420を、酵母エキス1%、ペプトン1%、食塩0.5%、グルコース0.5%から成る寒天平板培地(pH 7.0)に接種し、31℃で24時間培養した。ついでL-フェニルアラニン生産用の主培養培地として、表2に示す組成の培地を500ml容坂口コルベコに20mlずつ分注し、110℃で10分加熱殺菌後、炭酸カルシウム5%（別殺菌）を添加したものに、先の寒天平板培地で培養した菌体を接種し、31.5℃で72時間振盪培養した。培養終了後、発酵液計2lより遠心分離により菌体を分離除去した。

(4)

特開平5-123178

5

6

【0023】

【表2】

| 成 分 | 濃 度 |
|-----------------------|----------|
| グルコース | 100 g/l |
| 硫酸アンモニウム | 80 g/l |
| リン酸ナトリウム | 1 g/l |
| 硫酸マグネシウム | 0.4 g/l |
| 硫酸第一鉄 | 0.1 g/l |
| 硫酸マンガン | 0.01 g/l |
| 酢酸アンモニウム | 4 g/l |
| L-チロシン | 0.4 g/l |
| ビオチン | 100 μg/l |
| ビタミンB ₁ | 100 μg/l |
| 大豆蛋白加水分解物 (全窒素として) | 2 g/l |
| pH 7.0 | |

*【0024】この除菌液11に、先に示したエルビニア・ヘルビコーラ ATCC 21433のβ-チロシナーゼ活性含有菌体の全量を添加して、pH7.5とし30℃にて6時間反応させた。

【0025】β-チロシナーゼ活性含有菌体を発酵除菌液11に作用させた場合と、対照として同じ発酵除菌液11にβ-チロシナーゼ活性含有菌体を作用させなかった場合の各液におけるL-フェニルアラニン及びL-チロシンの濃度を測定した。また、各液をそれぞれ濃縮品析し、ついで結晶を純水に溶解して濃縮品析を3回繰り返すことにより得られた結晶中のL-フェニルアラニン及びL-チロシンの含有量を測定した。その結果、表3に示す結果が得られた。

【0026】

【表3】

*

| | | β-チロシナーゼの作用 | |
|--------------|------------------|-------------|------|
| | | 無し | 有り |
| 除菌液中 濃度 | L-フェニルアラニン (g/l) | 15.3 | 15.3 |
| | L-チロシン (g/l) | 0.25 | 0 |
| 単離結晶 中含有量 | L-フェニルアラニン (g) | 9.20 | 9.52 |
| | L-チロシン (g) | 0.19 | 0 |

【0027】これから明らかなように、β-チロシナーゼ活性含有菌体を作用させなかった場合は得られた結晶中にL-チロシンが残存していたのに対し、β-チロシ

ナーゼ活性含有菌体を作用させた場合は発酵除菌液中のL-チロシンが分解され、L-チロシンを含まない高純度のL-フェニルアラニン結晶を得ることができた。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

(C12P 13/22

C12R 1:185)

(C12P 13/22

C12R 1:37)

(C12P 13/22

C12R 1:20)

(C12P 13/22

C12R 1:05)